

個人識別における HLA-class II 遺伝子型の研究

市 瀬 章

信州大学医学部麻酔・蘇生学教室

(主任: 清野 誠一教授)

Studies on HLA-class II Genotyping for Personal Identification

Akira ICHINOSE

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Seiichi KIYONO)

Highly polymorphic HLA systems have contributed greatly to paternity testing and personal identification in forensic work. Recently HLA alleles in the class II region have been defined easily at the nucleotide level using the PCR (polymerase chain reaction) method. The PCR procedure involves the PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) method and the PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method.

In this study, HLA-DQA1 and -DPB1 alleles were defined in 150 unrelated healthy Japanese individuals using a modified PCR-RFLP method.

For the DQA1 alleles, 36 combinations including 8 homozygotes and 28 heterozygotes can be unequivocally determined. DQA1 * 0301 was the most frequent (37.8%) allele. For the DPB1 alleles, 189 out of 190 combinations including 19 homozygotes and 171 heterozygotes could be determined. DPB1 * 0501 was the most frequent (33.1%) allele.

Exclusion probability (EP) of the DQA1 and DPB1 were 51.4% and 57.3% respectively, these values being 1.2 to 3.0 times higher than that of conventional blood group markers (Gm and ABO). The HLA-DQA1 and DPB1 polymorphisms are considered to be useful for paternity testing and personal identification. *Shinshu Med. J.*, 40: 97-110, 1992

(Received for publication September 27, 1991)

Key words: HLA, genotyping, PCR-RFLP, personal identification, DQA1 and DPB1 allele

ヒト白血球抗原, 遺伝子型判定, 遺伝子増幅一制限酵素断片長多型, 個人識別, DQA1, DPB1 対立遺伝子

I 緒 言

ヒトの主要組織適合性抗原複合体 (MHC: major histocompatibility complex) である HLA 抗原 (human leucocyte-associated antigen) は, 免疫応

答, 疾患感受性および臓器移植に重要な役割を果たしている。また, HLA 抗原は検査手技も標準化され, 検査成績の再現性も良いうえ, 遺伝形質のなかで最も高度な遺伝的多型性を示すことから, 法医学における個人識別や親子鑑定実務¹⁻⁴⁾に用いられてきた。

従来、HLA 抗原は血清学的⁹⁾および細胞学的検査⁶⁾によりタイピングされてきたが、HLA クラス II 抗原の各種 cDNA クローンが分離・解析された結果、これらをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによる RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析から HLA-DNA タイピングが可能となった⁸⁾⁻¹⁰⁾。さらに最近では、DNA ポリメラーゼを用いて特定の HLA 遺伝子領域を試験管内で増幅させる PCR (polymerase chain reaction) 法が考案され¹¹⁾⁻¹²⁾、HLA 遺伝子の型判定が容易になった。現在、PCR を用いた HLA-DNA タイピングには 2 つの方法が確立されている。その 1 つは、遺伝的多型性に富む領域を選択的に増幅させ、増幅領域内のアロ抗原特異的な塩基配列に、人工的に作成したオリゴヌクレオチドプローブがハイブリッドするか否かで、HLA アロ抗原タイプを決定する PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) 法¹³⁾⁻¹⁴⁾であり、もう 1 つは増幅した領域にアロ抗原タイプ特異的制限酵素を反応させ、その切断の有無から HLA タイプを決定する PCR-RFLP 法 (改良 PCR-RFLP 法を含む)¹⁵⁾⁻¹⁷⁾である。PCR を用いた HLA-DNA タイピングは、現在のところクラス II 抗原についてはほぼ確立されつつある。また、従来のように操作が煩雑な一次混合リンパ球培養試験 (D 抗原タイピング) や二次混合リンパ球培養試験 (DP 抗原タイピング) の必要もなく、新鮮な標的細胞や被検細胞を用意する必要もないため、法医学領域をはじめ臨床医学領域でもその有用性が期待されている。

本研究は、改良 PCR-RFLP 法¹⁶⁾⁻¹⁷⁾を用いて健常人 150 人の血液から抽出した DNA より DQA1, DPB1 の遺伝子頻度を決定し、個人識別における有用性について検討した。また、微量乾燥血液から限外濾過チューブを用いて抽出した DNA から DQA1 遺伝子型タイピングを行い、さらに解剖死体の保存血から

得られた DNA を用いて、細胞学的方法では操作が煩雑なうえ判定が困難な DPB1 遺伝子型タイピングを試み、法医学領域における実用性と可能性について検討した。

II 材料と方法

A DQA1, DPB1 遺伝子頻度の算定

1 DNA 抽出

抗凝固剤 (ヘパリン) 入り試験管に一般健常人 (150 人) から採血した試料 (全血 10ml) を用いた。血液からの DNA 抽出は、文献¹⁸⁾に従った。分離した有核細胞に、lysis buffer [50 mM Tris aminomethane-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA, 0.1M NaCl, 1% SDS] 0.6ml を加え、proteinase K を 150 μ g/ml とするように加え、50°C で 5 時間以上反応させた。

0.4M Tris-HCl で飽和したフェノール溶液によりフェノール抽出操作を 2~3 回行った。抽出した上層 (DNA 層) に、RNase A; 80 μ g/ml, RNase T1; 2,400units/ml とするようにならぬようにそれぞれ加え、37°C 3 時間反応後、全容量の 1/10 量の 3M 酢酸カリウム溶液 (pH 5.2) と、2 倍量の冷純エタノールを加え、DNA を回収した。

DNA は冷純エタノールにてフェノール残存がないように 2~3 回繰り返し洗浄し、最後に冷 70% エタノールで洗浄した後、減圧乾燥し、およそ 1 μ g/ μ l になるように滅菌蒸留水を加え溶解させ、使用時まで 4°C に保存した。

2 DNA の増幅 (PCR)

a 反応液

滅菌蒸留水	82.5 μ l
DNA (1 μ g/ μ l)	1 μ l
Buffer	10 μ l
KCl	500mM
Tris-HCl (pH 8.4)	100mM

表 1 DQA1, DPB1 遺伝子増幅に用いるプライマーと制限酵素

対立遺伝子	プライマー (5' to 3')	制限酵素
DQA1	GH26: GTGCTGCAGGTGTAACCTTGACCAG	ApaI, HphI, BsaJI
	GH27: CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG	FokI, MboII
DPB1	DPB101: GTGAAGCTTCCCCGCAGAGAATTAC	BspI286I, FokI, DdeI
	DPB201: CACCTGCAGTCACTCACCTCGGCGCTG	BsaJI, BssHIII, CfrI3I RsaI, EcoNI, AvaII

個人識別における HLA クラス II 遺伝子

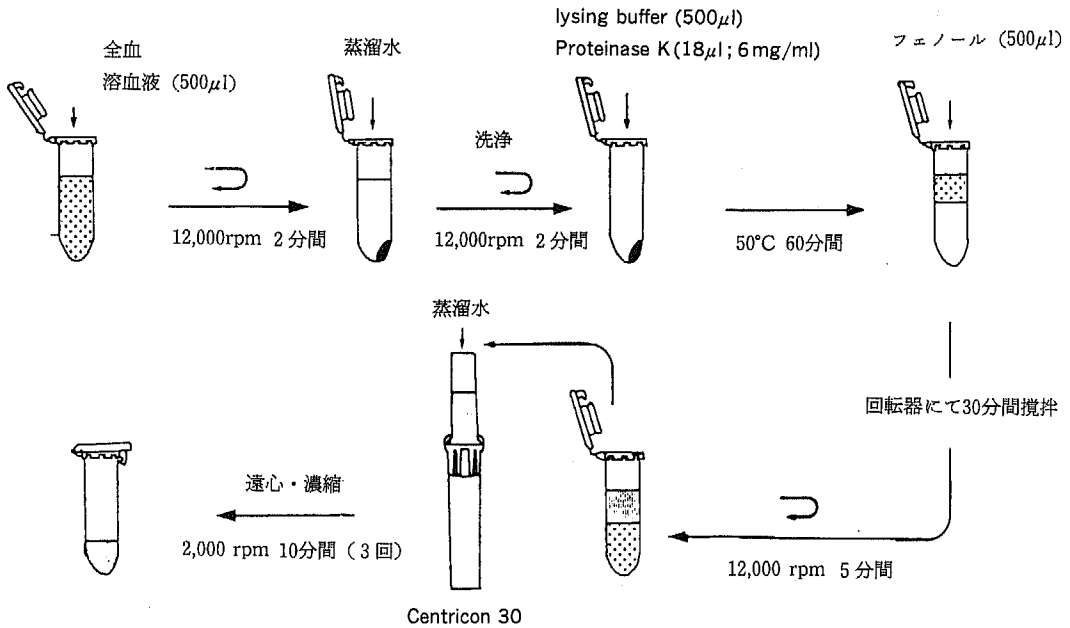


図1 微量濃縮法

表2 DPB1 遺伝子型と9種類の制限酵素による切断パターン¹⁷⁾

対立遺伝子 DPB1	制限酵素								
	Bsp1286I	FokI	DdeI	BsaJI	BssHII	Cfr13I	RsaI	EcoNI	AvaII
0401	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1801=0402*	1	1	0	1	0	1	1	0	0
0201	1	1	0	1	0	1	1	1	0
0202	1	1	1	1	0	1	1	1	0
0801=1601 [§]	0	1	0	1	0	0	1	1	0
0501	1	1	1	1	0	0	1	0	0
0301	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0601	0	1	0	0	0	1	1	1	1
1101	0	1	0	0	1	1	1	1	1
0101	0	1	0	1	1	0	1	0	0
0901=1701 [#]	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1001	1	1	0	0	0	0	1	1	0
1301	0	1	0	0	1	0	1	1	0
1901	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1401	1	0	0	0	0	1	0	1	1
1501	1	1	0	1	1	1	1	1	1

0 : 非切断, 1 : 切断

* : DPB1*1801と0402は, RsaI 制限酵素処理により, 1801のホモは147bp のバンドが出現し, 0402のホモは177bp のバンドが出現することから判別。1801/0402のヘテロは, 147bp と177bp のバンドが出現する。[§] : DPB1*0801と1601は, FokI 制限酵素処理により, 0801は116bp のバンドが出現, 1601は116bp のバンドが出現しないことから判別。[#] : DPB1*0901と1701は, FokI 制限酵素処理により, 0901は116bp のバンドが出現, 1701は116bp のバンドが出現しないことから判別。

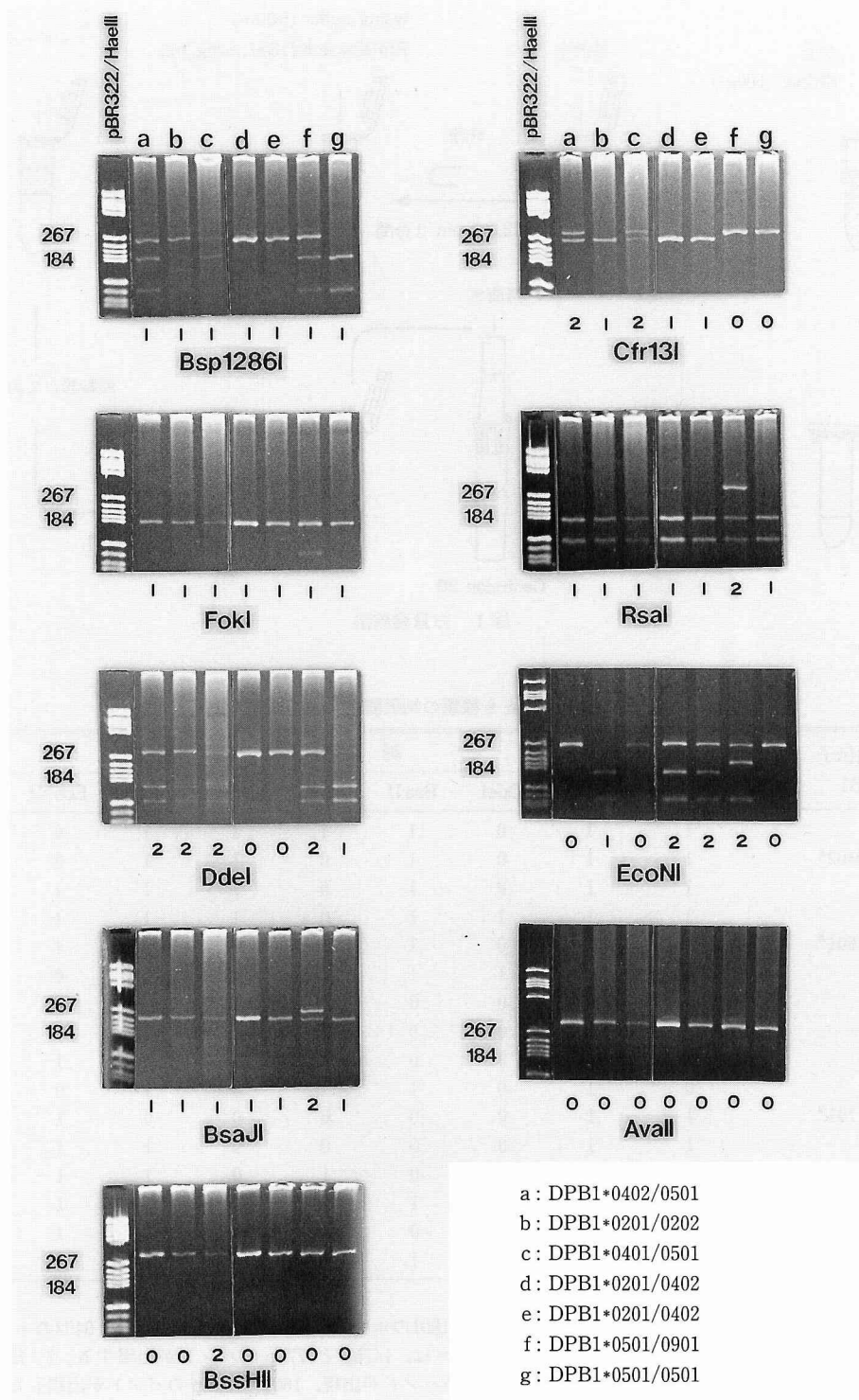


図2 健康成人7人の改良PCR-RFLP法によるDPB1パターン

個人識別における HLA クラス II 遺伝子

MgCl₂ 25mM
 gelatin 0.01% (W/V)
 NONIDET P-40 (SIGMA 社) 0.2% (W/V)

dNTP (ATP, CTP, TTP, GTP) 各200 μ moles

DPB1 遺伝子増幅: DPB1 特異的 Primer (表 1)

DPB101 (1 ng/ μ l) 1 μ l

DPB201 (1 ng/ μ l) 1 μ l

DQA1 遺伝子増幅: DQA1 特異的 Primer (表 1)

GH26 (1 ng/ μ l) 1 μ l

GH27 (1 ng/ μ l) 1 μ l

Taq polymerase (宝酒造) 0.5 μ l

以上を1.5mlのエッペンドルフチューブ中で十分混和し、反応液の蒸発を防ぐため2滴のミネラルオイルを上層に滴下した。

b DNA 増幅反応

(1) DPB1 遺伝子: 第 1 サイクルは、92°C 2 分間の denature, 62°C 1 分間の annealing, 72°C 2 分間の extension を行い、第 2 サイクルからは denature を 1 分間にして計 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分間の extension を加えた。

(2) DQA1 遺伝子: annealing の温度を 60°C にした以外は、DPB1 と同じ条件で増幅反応を行った。

3 制限酵素処理

a DPB1 遺伝子: マイクロプレートに増幅 DNA 液 5 μ l および表 1 に示した各制限酵素 0.5 units を、おのおのの制限酵素に対する 10 倍濃縮緩衝液 1 μ l と混和し、37°C で一晚反応させた後、反応停止液 (0.5% SDS, 30% glycerol, 0.2% BPB, 0.2% XC, 10mM Tris, 1 mM EDTA) 1.5 μ l を加えた。ただし、BsaJI は 60°C で 1 時間、BssH II は 50°C で 1 時間反応させた。

b DQA1 遺伝子: マイクロプレートに増幅 DNA 液 5 μ l を表 1 に示した各制限酵素 0.5 units とおのおのの制限酵素に対する 10 倍濃縮緩衝液 1 μ l と混和し、37°C で一晚反応させた後、1.5 μ l 反応停止液を加えた。ただし、BsaJI は 60°C で 1 時間反応させた。

4 電気泳動

制限酵素処理した試料を、12% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分析した。サイズマーカーとして、Hae III 処理した pBR322 を用いた。泳動装置 (Mupid II; Cosmo Bio 社) で泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線で発色させバンドを検出した。

B 微量乾燥血液からの DQA1 タイピング

抗凝固剤 (ヘパリン) の入った血液 5, 10, 25, 50 および 100 μ l を 2 ml エッペンドルフチューブにそれぞれ分注し、約 1 カ月、3 カ月、6 カ月、1 年、1 年半室温に放置したものを用いた。微量濃縮法 (図 1) を用いて、試料に 2 倍量の溶液 (NH₄Cl; 8.26g, KHCO₃; 1 g, EDTA; 37mg/l H₂O) を加え溶解させ

表 3 DPB1 遺伝子頻度

遺伝子型	n(150)	P. F.	G. F.
DPB1*0101	0	0.000	0.000
DPB1*0201	48	0.320	0.175
DPB1*0202	14	0.093	0.048
DPB1*0301	10	0.067	0.034
DPB1*0401	14	0.093	0.048
DPB1*0402	35	0.233	0.124
DPB1*0501	83	0.553	0.331
DPB1*0601	1	0.007	0.004
DPB1*0801	0	0.000	0.000
DPB1*0901	29	0.193	0.102
DPB1*1001	0	0.000	0.000
DPB1*1101	0	0.000	0.000
DPB1*1301	4	0.027	0.014
DPB1*1401	3	0.020	0.010
DPB1*1501	0	0.000	0.000
DPB1*1601	2	0.013	0.007
DPB1*1701	0	0.000	0.000
DPB1*1801	0	0.000	0.000
DPB1*1901	0	0.000	0.000

P. F.: 表現頻度

G. F.: 遺伝子頻度

表 4 DQA1 遺伝子型と 5 種類の制限酵素による切断パターン¹⁷⁾

対立遺伝子 DQA1	制限酵素				
	ApaLI	HphI	BsaJI	FokI	MboII
0101=0102*	1	0	0	0	0
0103	1	1	0	0	1
0201	0	1	0	1	0
0301	0	0	0	0	1
0401	0	0	1	1	0
0501	0	0	1	0	0
0601	0	1	1	1	0

0: 非切断, 1: 切断

*: DQA1*0101 と 0102 は、MnII の切断パターンで判別。

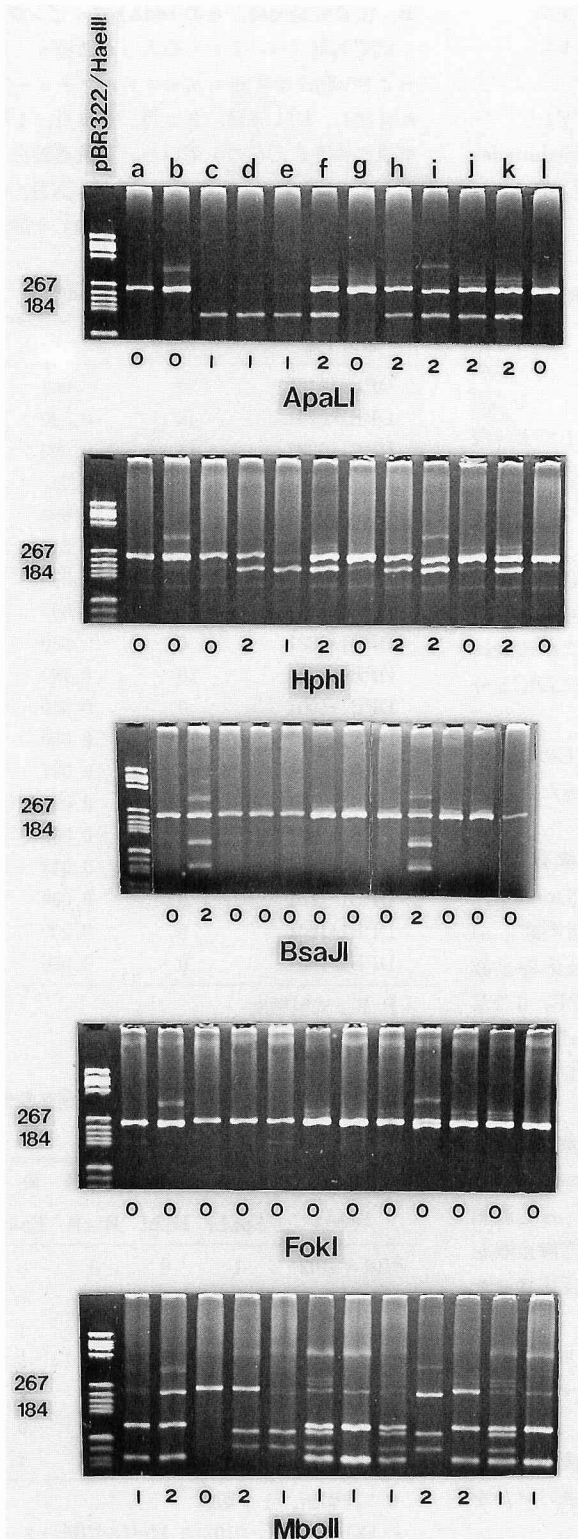


図3 健康成人12人の改良 PCR-RFLP 法による DQA1 遺伝子型

- a : DQA1*0301/0301
- b : DQA1*0301/0501
- c : DQA1*0101/0102
- d : DQA1*0102/0103
- e : DQA1*0103/0103
- f : DQA1*0103/0301
- g : DQA1*0301/0301
- h : DQA1*0103/0301
- i : DQA1*0103/0501
- j : DQA1*0102/0301
- k : DQA1*0103/0301
- l : DQA1*0301/0301

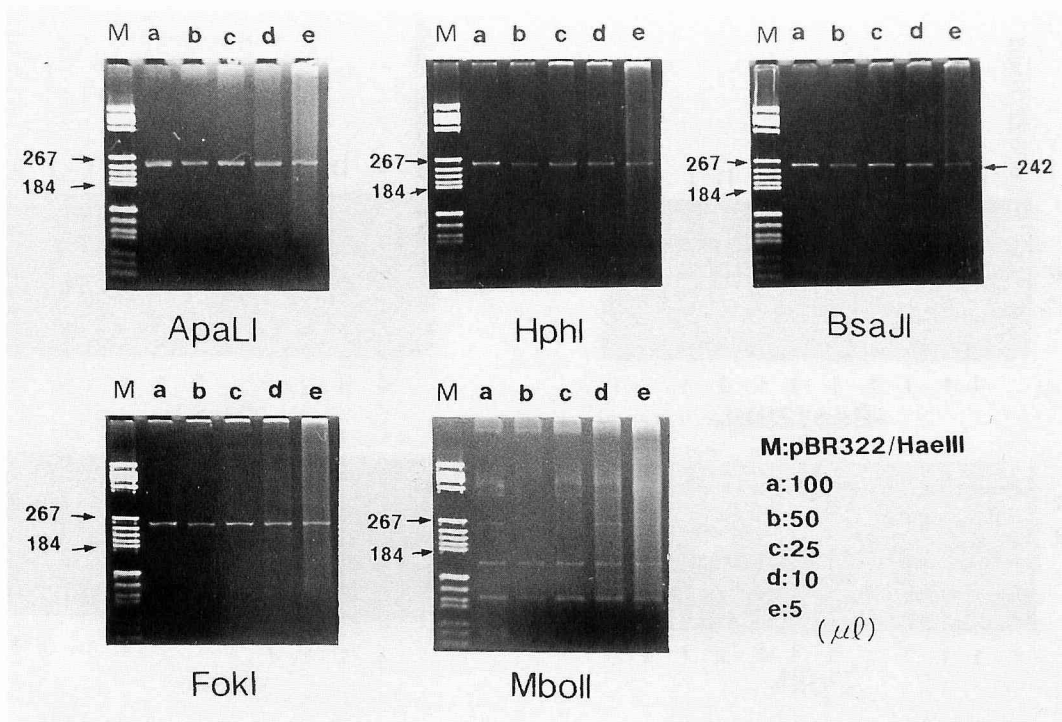


図4 微量濃縮法を用いた、改良 PCR-RFLP 法による、血液量の違いと DQA1 (DQA1*0301/0301) パターン

表5 DQA1遺伝子頻度

遺伝子型	n(150)	P. F.	G. F.
DQA1*0101	45	0.300	0.163
DQA1*0102	48	0.320	0.175
DQA1*0103	56	0.373	0.208
DQA1*0201	1	0.007	0.004
DQA1*0301	92	0.613	0.378
DQA1*0401	1	0.007	0.004
DQA1*0501	22	0.147	0.076
DQA1*0601	4	0.027	0.014

P. F.: 表現頻度

G. F.: 遺伝子頻度

した後、12,000rpmで2分間遠心した。上清を除去した後、沈澱した細胞を生理食塩水で洗浄し、再度上清を除去した。これに、500μlの lysis buffer, 18μlの proteinase K (150μg/ml)を加え50°Cで、1時間細胞を溶解させた。これに、400mM Tris-HClで飽和したフェノール溶液を500μl加え、回転器 (ROTATOR RT-50; TAITEC社)で400rpm, 30分間回転

した後、12,000rpmで5分間遠心し、上層 (DNA層)をフェノールが混入しないように吸い取り、限外濾過チューブ (Centricon 30; Amicon社)に移した。TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8.0)をセントリコン30に加え総量2mlとし、2,000rpmで20分間遠心・濃縮した。この操作を2回繰り返す、最後に滅菌蒸留水で1回洗浄濃縮操作を行いPCR用の試料とした。

C 解剖死体の保存血からの DPB1 タイピング

法医解剖死体より得た血液からDNAを抽出しDPB1遺伝子型の判定を行った。血液5mlを前述した溶液にて溶解後、沈澱細胞から健常人で行った方法に基づきDNA抽出を行った。得られたDNAは1μg/μlになるように滅菌蒸留水を加え、4°Cに保存しPCRに用いた。

III 結果

A 改良 PCR-RFLP 法による健常成人150人の DPB1 遺伝子型と DQA1 遺伝子型

1 DPB1 遺伝子型

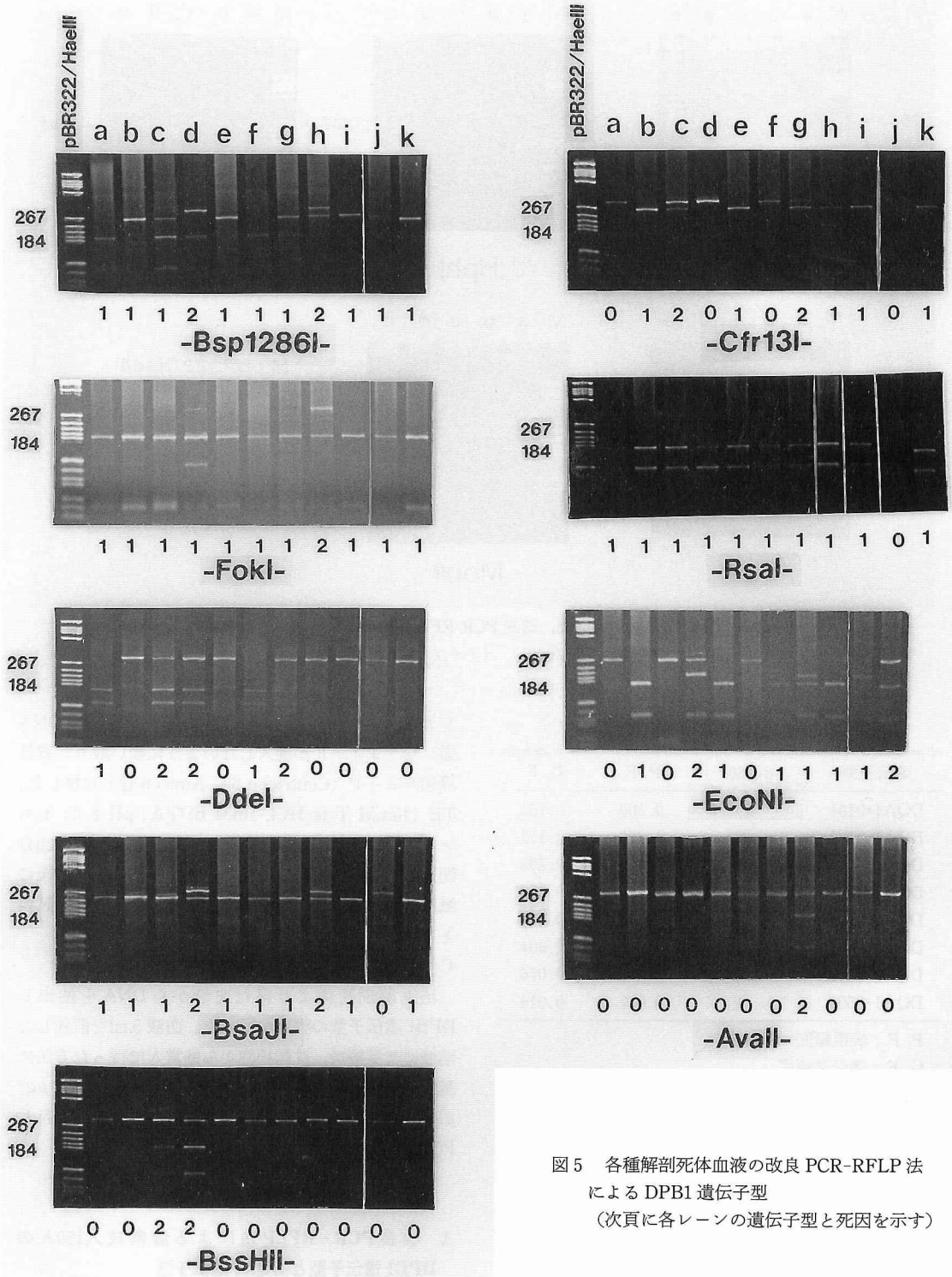


図5 各種解剖死体血液の改良 PCR-RFLP 法による DPB1 遺伝子型 (次頁に各レーンの遺伝子型と死因を示す)

レーン	DPB1 遺伝子	剖検年	死 因
a	0501/0501	1989	失血死
b	0201/0201	1989	脳膜炎
c	0401/0501	1989	外傷性クモ膜下出血
d	0501/1301	1989	脳挫傷
e	0201/0201	1989	脳挫傷
f	0501/0501	1989	溺 死
g	0201/0501	1989	下行大動脈破裂
h	0201/0301	1989	大動脈および左肺損傷
i	0201/0201	1989	全身挫滅
j	0901/0901	1990	脳挫傷
k	0402/0201	1990	延髄破裂

改良 PCR-RFLP 法¹⁰⁾¹⁷⁾とは、19種類の DPB1 対立遺伝子について、その第 2 エキソン部分 299bp を表 1 に示したプライマーを用いて PCR 法により増幅し、アロ抗原に特異的な各種制限酵素により切断される (1 と表記) 場合と、切断されない (0 と表記) パターンの組合せによって遺伝子型を決定する方法である。

現在 DPB1 遺伝子座には 19 種類の対立遺伝子が確認¹⁹⁾されている。改良 PCR-RFLP によるこれらの遺伝子のホモ接合体の標準パターンを表 2 に示した。これらのホモ接合体パターンの任意の 2 つの組合せがヘテロ接合体である。たとえば DPB1*0401/0201 型は、表 2 で示した DPB1*0401 と DPB1*0201 の組合せであり、BspI286I, FokI, DdeI, BsaJI, BssHII, Cfr13I, RsaI, EcoNI, AvaII 制限酵素で処理すると、1, 1, 0, 1, 2; 1, 1, 2, 0 のパターンになる。ここで示す 2 は一方の対立遺伝子は制限酵素で切断される (1) が、他方の対立遺伝子は切断されない (0)、すなわちヘテロ接合体であることを意味している。図 2 は今回検査した一般健常人の改良 PCR-RFLP 図の一部である。なお、改良 PCR-RFLP 法では、ホモ・ヘテロ合わせて 189 種類の DPB1 遺伝子型が判定可能である。この方法を用いて 150 人について行った DPB1 各対立遺伝子の表現頻度と遺伝子頻度を表 3 に示した。

なお、遺伝子頻度は次の式により求めた。

$$p = 1 - \sqrt{1 - f}$$

ここで、p は遺伝子頻度を表し、f は表現頻度を表す。

19 種類の対立遺伝子のうち 11 種類がタイピングされ、最も頻度の高かった型は DPB1*0501 (33.1%) で、ついで DPB1*0201 (17.5%)、DPB1*0402 (12.4%)、

DPB1*0901 (10.2%) の順で続き、DPB1*0101, 080I, 100I, 110I, 150I, 170I, 180I は今回は認められなかった。

2 DQA1 遺伝子型

8 種類の DQA1 対立遺伝子について DPB1 と同様、5 種類の制限酵素で切断した標準パターンを表 4 に示す。DQA1 遺伝子は、ホモ・ヘテロ合わせて、36 種類の遺伝子が判定可能である。図 3 は、今回検査した一般健常人の PCR-RFLP 図の一部である。

150 人について行った DQA1 各対立遺伝子の DNA タイピングによる表現型頻度と遺伝子頻度を表 5 に示した。今回 8 種類の対立遺伝子全てをタイピングし、最も頻度が高かった型は、DQA1*0301 (37.8%) であり、ついで DQA1*0103 (20.8%)、DQA1*0102 (17.5%) の順であった。

B 乾燥血液からの DQA1 タイピング

1 カ月、3 カ月、6 カ月、1 年、1 年半保存した乾燥血液 (それぞれ 5, 10, 25, 50, 100 μ l) から限外濾過チューブを用いて DNA を抽出し、改良 PCR-RFLP を行った。いずれの血液量からも DQA1 遺伝子は増幅され、タイピングも可能であった (DQA1*0301/0301)。また、1 年半経過したものでもタイピングが可能であった (図 4)。

C 解剖死体の保存血からの DPB1 タイピング

11 例の解剖死体より得た血液より DNA を抽出し、改良 PCR-RFLP を行った。死因や試料の保存期間に関係なく、全ての症例で DPB1 遺伝子型が判定された。各症例の死因および DPB1 タイピングの結果を図 5 に示した。

IV 考 察

従来、個人識別には指紋が最も有力な形質とされてきたが、検査できる血液型の種類が増すにつれて、血液型判定もその価値が高くなってきた。血液型は血液を構成する全ての成分について識別可能な遺伝形質（個人差）を示し、その型はメンデルの法則に従って親から子へ規則正しく遺伝するため、親子鑑定において最も重要な形質である。

現在、個人識別や親子鑑定に利用される血液型は、ABO 式などの赤血球型、Hp 型などの血清型、AcP 型などの酵素型および白血球型など30種類以上のシステムが用いられている。これらのシステムのうち最も遺伝的多型性に富んでいるのが HLA システムである。血液型遺伝形質のうち個人識別や親子鑑定に有効であるかを評価するのに、その形質が示す識別率²⁰⁾（任意の2例の血液型を異なる血液型として識別できる型分け能力）と父権絶対否定確率（排除率：ある子供と母親の組合せの時、絶対的に否定される一般の男性の確率）を指標として表される。ABO 式血液型の識別率は70%、Rho (D) で1%、HLA 式血液型9因子、B7、B35、B44、B51、Bw52、Bw54、Bw60、Bw61、Bw62では94%と高くなる。一方、父権絶対否定確率は、ABO 式血液型では19.2%、MNSs 式血液型で23.5%、HLA-B 型の対立遺伝子数38の場合は80.9%となる²¹⁾。HLA 型のように対立遺伝子の数が多く、遺伝子頻度が均一に分散している遺伝形質では、これらの値が他の血液型に比べ有意に高いため個人識別および親子鑑定に有効であることが示唆される。

今まで、これら血液型検査は細胞表面および血清中に遊離した糖や蛋白等の遺伝子産物の多型性を確認してきた。しかし、これらの本体である DNA レベルでの研究が進むに従い、DNA 多型性の検索法が開発され、個人識別に利用されるようになった。

DNA 多型性に関する研究は、2つに大別される。1つは、各染色体上の遺伝子座（マルチローカス：ML）に存在する繰り返し構造の差から行う個人識別であり、これは Jeffreys ら²²⁾によるヒトミオグロビン遺伝子のイントロン中に存在する反復配列（33塩基）をプローブとして用い、サザンブロットハイブリダイゼーションで得られた個人特異的な多数のバンドパターンを調べる“DNA フィンガープリント（DNA 指紋）”法である。日本では、おもに“Myo”プローブを用いた DNA フィンガープリントが試みられてい

る²³⁾²⁴⁾。もう1つは、特定の染色体上にある遺伝子座（シングルローカス：SL）に存在する遺伝的多型性を検出する方法である。これは、Wyman と White²⁵⁾が報告した高多型性を示す座位を基に、Nakamura ら²⁶⁾が同定した YNH24 や YNZ22 のシングルローカス (SL) VNTR (variable number of tandem repeat) を用いる方法である。ある個人の1カ所の SL-VNTR 部位は、父親側からと母親側から1つずつ遺伝し、それぞれ異なった長さであれば電気泳動法によって2つのバンドとして検出され（異型接合）、それぞれが同じ長さであれば1つのバンドとして検出される（同型接合）。VNTR 部位の PCR 増幅は、いまだ体系的に解明されていない点が多いが、今後明らかにされるであろう。

血液型についても DNA レベルでの解析が行われるようになり、白血球型では近年、HLA-DR、-DQ、-DP の各クラス II 抗原の α 鎖と β 鎖の cDNA クローンが分離・解析され、従来の血清学的および細胞学的方法によって検出されてきた HLA 抗原の各アロタイプ遺伝的多型性が、DNA レベルで調べることが可能になった²⁷⁾⁻²⁹⁾。当初、各 HLA 抗原の cDNA クローンをプローブとするサザンハイブリダイゼーションを用いた RFLP 法が行われていた⁹⁾⁻¹⁰⁾。しかしこの方法には、最終判定までに5~6日の長時間を要することや、試料 DNA が多量に必要であることや、HLA タイプを決定しているエピトープのアミノ酸配列の多型性を反映していないなどの問題点があったため、最近この方法の欠点を補う新しい DNA タイピング法が考案された。PCR を用いて HLA 抗原遺伝子型を直接タイプする PCR-SSO 法¹³⁾¹⁴⁾と PCR-RFLP 法¹⁵⁾である。PCR-SSO 法は原理的にすべての DNA 変異を直接検出できる利点があるが、HLA のように非常に多数の対立遺伝子や塩基配列の変異がある場合には、多数のプローブとのハイブリダイズを繰り返さねばならないため相当の手間がかかり、また HLA クラス II 遺伝子群だけで200種類近いプローブを必要とすることや放射性同位元素の使用などいくつかの欠点がある。一方、当初開発された PCR-RFLP 法は制限酵素切断片におけるバンドの組合せで型判定を行ったため、バンドが近接している場合は非常に判定が困難であった。そこで Ota ら¹⁶⁾¹⁷⁾は、これらの欠点を改善した改良 PCR-RFLP 法を開発した。この方法は各種制限酵素により、切断される場合と切断されない場合の組合せで遺伝子型を決定するため、判定が容易なう

え検査の全行程を1日以内で行うことが可能であり、さらに自動機械化が可能であることや放射性同位元素を必要としないことから日常検査として一般の検査室レベルでの有用性が非常に大きい。

A DPB1, DQA1 の遺伝子頻度の算定

DNA レベルで解析できるようになった HLA 抗原であるが、個人識別や親子鑑定に用いる場合、日本人集団における抗原の遺伝子頻度が正確に調べられていないと、識別率や父権絶対否定確率が算出できず、実務上使用することが困難である。著者は改良 PCR-RFLP 法を用いて、HLA のクラス II 抗原である DPB1 と DQA1 の遺伝子頻度を求め、親子鑑定における父権絶対否定確率と識別率を計算し、その有用性を検討した。

HLA クラス II 抗原遺伝子のうち高度の多型性（すなわちアロ抗原性）を示すのは、DQA1, DQB1, DRB1 および DPB1 遺伝子である。このうち DQB1 と DRB1 遺伝子はそれぞれ1つの5'末端および3'末端側プライマーですべての対立遺伝子をタイプすることができない。それに対し、DQA1 および DPB1 遺伝子は、本研究で使用したプライマーですべての対立遺伝子の型判定が可能であり、さらに DPB1 遺伝子は DQA1, DQB1, DRB1 と連鎖不平衡の関係にないため今回はこれらの遺伝子に関して研究した。

DPB1 の父権絶対否定確率は、次式²¹⁾より求めた。

$$P_{HLA}(m) = \sum_{i=1}^{m-1} p_i(p_i + p_r)(1 - p_i - p_r)^2 + \sum_{i=1}^{m-1} p_i(p_i + r + p_r)[(1 - p_i - r)^2 + p_i^2 - H] + \sum_{i=1}^{m-1} p_i(1 - p_i)^4 + r^2[(1 - r)^2 - H]$$

ただし、 $H = \sum_{i=1}^{m-1} p_i^2$ は抗原遺伝子のホモ接合の程度で、 p_i は第 i 番目の抗原を支配する対立遺伝子の頻度、 r は沈黙遺伝子の頻度である。表3の DPB1 の遺伝子頻度より、父権絶対否定確率を求めると、 $P_{(HLA)} = 57.3\%$ となり、DQA1 の父権絶対否定確率は、 $P_{(HLA)} = 51.4\%$ であった。

日本人集団で通常利用されている血液型、血清型、酵素型の中でも父権絶対否定確率の高い上位6システムの数値は、Gm型40.7%、Gc型38.2%、PGM1型26.4%、Rh型23.7%、MNSs型23.5%、ABO型19.2%²¹⁾であり、今回求められた DPB1 と DQA1 の父権絶対否定確率は、より実用性の高いものと考えら

れた。

また識別率を各遺伝子頻度より求めたところ、DQA1 で89.7%、DPB1 で93.6%となった。前述した ABO 型、Rh 型より高く、HLA-B 型と同程度の値であることから、個人識別において有用性が高いと考えられる。

B 微量乾燥血液からの DQA1 タイピング

現在、犯罪現場の血痕資料から特定の個人を識別するためには、血液型、血清型および酵素型などの遺伝的多型形質を用いている。しかし、実際には血痕の量や状態によって、これらの遺伝的形質が十分検出できないことも多く、血痕が非常に微量だった場合や、長期間経過した陳旧血痕などの場合は、特定個人を識別することが非常に困難なこともある。特に、多型性に富む HLA 抗原は、新鮮な細胞でない場合、型判定が困難であった。

PCR-RFLP 法による HLA タイピングと血痕量および保存期間についての報告はなされていないため、各種血痕を作成し、改良 PCR-RFLP 法による DQA1 タイピングの可能性について検討した。

その結果、血痕量では5 μ l の微量血痕からでも DQA1 のタイピングが可能であり、また保存期間は今回検討した最長の1年半経過したものでも検出可能であった。

今回得られた結果より、改良 PCR-RFLP 法は非常に検出感度が高く、また DNA 抽出においてもセントリコン30を使用することにより短時間に行い得ることから、法医学領域における有用性と実用性の点で優れていると考えられる。

C 解剖死体の保存血からの DPB1 タイピング

日常の法医学の業務において、DNA 型検出の問題点としては、試料の腐敗、希釈および汚染などが考えられ、DNA の抽出に大きな影響を及ぼすことが指摘されている³⁰⁾³¹⁾。

そこで著者は、実際の応用例として解剖死体の保存血から改良 PCR-RFLP 法による DPB1 のタイピングを試みた。今回の解剖死体の中にも、死後数日経過したものが含まれているが、表5に示したように全例で DPB1 タイピングが可能であった。これは、採取した血液が比較的新鮮であったためと考えられるが、今後、死後経過時間や死体の置かれた環境条件などの影響も検討する必要がある。しかし従来、新鮮な血液を用いても容易に型判定ができなかった DPB1 抗原が、死後数日経過した死体からの血液でも型判定が可能とな

ったことは法医学実務に影響が大きいといえる。

V 結 語

高度の遺伝的多型性を示す HLA クラス II 抗原のうち、DQA1 遺伝子および DPB1 遺伝子多型性の個人識別への有用性を改良 PCR-RFLP 法を用いて検討した。

1 健康成人150人の血液から抽出した DNA から DQA1 と DPB1 遺伝子型を判定した。その結果 DQA1 遺伝子型は DQA1*0301 が最も多く、遺伝子頻度 37.8%。ついで DQA1*0103 (20.8%), 0302 (17.5%), 0101 (16.3%) であり、最も少なかったのは DQA1*0401 (0.4%) であった。DPB1 遺伝子型は、DPB1*0501 が最も多く 33.1% で、ついで DPB1*0201 (17.5%), 0402 (12.4%) であり、タイプされたなかで最も少なかったのは DPB1*0601 (0.4%) であった。得られた遺伝子型より識別率と父権絶対否定確率を求めると、DQA1 遺伝子型では 89.7% と 51.4%, DPB1 遺伝子型では 93.6%

と 57.3% であった。

2 微量乾燥血液から抽出した DNA を用いて DQA1 遺伝子型判定を行い、検出感度の検討を行った結果、1 年半経過の 5 μ l 血液でも型判定可能であった。

3 解剖死体の保存血液から抽出した DNA を用いて DPB1 遺伝子型判定を行った結果、死後数日経過した解剖死体からでも全例で型判定可能であった。

以上より、改良 PCR-RFLP 法を用いた HLA クラス II 遺伝子 (DQA1, DPB1) タイピングは、個人識別や親子鑑定において有用であることが示唆された。

本稿の要旨は、第75次日本法医学会総会 (1991年4月, 京都) および、第14回国際法医学血液遺伝学会 [1991年9月, マインツ (ドイツ国)] で発表した。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました清野誠一教授ならびに法医学教室、福島弘文教授、さらに研究の始めから懇篤なる御指導と御助言をいただいた太田正穂講師に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Jeannet, M., Hässig, A. and Bernheim, J.: Use of the HLA antigen system in disputed paternity cases. *Vox Sang*, 23: 197-200, 1972
- 2) Terasaki, P. I., Bernoco, D., Gjertson, D., Mickey, M. R. and Perdue, S.: Ninety-five percent probability of paternity with HLA, ABO and haptoglobins. *Forensic Sci Int*, 12: 227-232, 1978
- 3) Hansen, H. E. and Gurtler, H.: HLA-typing of a dead man by a microabsorption method: Solution of a paternity case. *Tissue Antigens*, 13: 61-66, 1979
- 4) Ota, M., Okajima, H., Yonemura, I., Hasekura, H. and Ishimoto, G.: Usefulness of the leukocyte HLA groups in paternity confirmation and exclusion. *Jpn J Legal Med*, 38: 773-777, 1984
- 5) Terasaki, P. I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G. and Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. *Am J Clin Pathol*, 69: 103-120, 1978
- 6) Bach, F. H., Inouye, H., Hank, J. A. and Alter, B. J.: Human T lymphocyte clones reactive in primed lymphocyte typing and cytotoxicity. *Nature*, 281: 307-309, 1979
- 7) Shaw, S., Johnson, A. H. and Shearer, G.M.: Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogenic proliferative and cytotoxic response. *J Exp Med*, 152: 565-580, 1980
- 8) Owerbach, D., Lernmark, A., Rask, L., Peterson, P. A., Platz, P. and Svejgaard, A.: Detection of HLA-D/DR-related DNA polymorphism in HLA-D homozygotes typing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 3758-3761, 1983
- 9) Inoko, H., Ando, A., Ito, M. and Tsuji, K.: Southern hybridization analysis of DNA polymorphism in the HLA-D region. *Hum Immunol*, 16: 304-313, 1986
- 10) Maeda, M., Inoko, H., Ando, A., Uryu, N. and Tsuji, K.: HLA-D typing of heterozygotes using restriction fragment length polymorphisms in the HLA-DQ region on the basis of standard band patterns derived from HLA homozygotes. *Hum Immunol*, 25: 195-205, 1989

- 11) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354, 1985
- 12) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491, 1988
- 13) Gyllenstein, U. B. and Erlich, H.: Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 7652-7656, 1988
- 14) Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H. and Erlich, H.: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 6230-6234, 1989
- 15) Maeda, M., Uryu, N., Murayama, N., Ishii, H., Ota, M., Tsuji, K. and Inoko, H.: A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases. *Hum Immunol*, 27 : 111-121, 1990
- 16) Ota, M., Inoko, H., Ichinose, A., Tsuji, K., Fukushima, H. and Hasekura, H.: Application of modified PCR-RFLP method in forensic science. *Proceedings of The First International Symposium Advances in Legal Medicine*, pp. 474-476, 1990
- 17) Ota, M., Seki, T., Nomura, N., Sugimura, K., Mizuki, N., Fukushima, H., Tsuji, K. and Inoko, H.: Modified PCR-RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping. *Tissue Antigens*, 38 : 60-71, 1991
- 18) 太田正穂: RH および HLA 各血液型システムの遺伝子型判定法に関する研究. *信州医誌*, 37 : 605-620, 1989
- 19) Bodmer, J. G., Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Dupont, B., Erlich, H. A., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G. M. Th., Strominger, J. L., Svejgaard, A. and Terasaki, P. I.: Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 37 : 97-104, 1991
- 20) Fisher, R. A.: Standard calculations for evaluating a blood-group system. *Heredity(Lond)*, 5 : 95-102, 1951
- 21) 安田徳一: 親子鑑定と HLA. *実験医学*, 4 : 53-59, 1986
- 22) Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L.: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314 : 67-73, 1985
- 23) 本間正充, 石山豊夫: DNA フィンガープリント: その法医学的利用(1)—ミニサテライト DNA プローブの親子鑑定への応用—. *日本法医学会誌*, 41 : 236-241, 1987
- 24) Honma, M. and Ishiyama, I.: Variability of DNA fingerprint in a Japanese population. *Jpn J Legal Med*, 43 : 243-245, 1989
- 25) Wyman, A. R. and White, R.: A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 6754-6758, 1980
- 26) Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culvet, M., Martin, C., Fujimoto, E. and White, R.: Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235 : 1616-1622, 1987
- 27) Wake, C., Long, E. and Mach, B.: Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR β -chains—direct analysis by DNA-DNA hybridization. *Nature*, 300 : 372-374, 1982
- 28) Anderson, M., Böhme, J., Andersson, G., Möller, E., Thorsby, E., Rask, L. and Peterson, P. A.: Genomic hybridization with class II transplantation antigen cDNA probes as a complementary technique in tissue typing. *Hum Immunol*, 11 : 57-67, 1984
- 29) Böhme, J., Andersson, M., Andersson, G., Möller, E., Peterson, P. A. and Rask, L.: HLA-DR β genes vary

- in number between different DR specificities, whereas the number of DQ β genes is constant. J Immunol, 135 : 2147-2155, 1985
- 30) McNally, L., Shaler, R. C., Baird, M., Balazs, I., Forest, P. D. and Kobilinsky, L. : Evaluation of deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from human bloodstains exposed to ultraviolet light, heat, humidity, and soil contamination. J Forensic Sci, 34 : 1059-1069, 1989
- 31) McNally, L., Shaler, R. C., Baird, M., Balazs, I., Kobilinsky, L. and Forest, P. D. : The effects of environment and substrata on deoxyribonucleic acid (DNA) : The use of casework samples from New York City. J Forensic Sci, 34 : 1070-1077, 1989

(3. 9. 27 受稿)
